

博士（農 学） 畠 谷 達 児

学 位 論 文 題 名

ジャガイモ Y ウィルスえそ系統と普通系統の
分子性状比較とゲノム RNA 間組換えに関する研究

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

ジャガイモ Y ウィルス (PVY) は、アブラムシで非永続伝搬される屈曲性ひも状ウィルスで、ジャガイモの他に、タバコ、トマト、トウガラシに被害を与える重要病害ウィルスである。日本では病原性の異なる普通系統 (PVY-O) とえそ系統 (PVY-T) が知られており、PVY-O は日本のジャガイモ品種に、えそ型症状や、れん葉型症状をもたらすが、PVY-T が日本のジャガイモ品種にもたらす症状は一般に軽微である。しかし、タバコでは PVY-O がモザイク症状をもたらすのに対し、PVY-T は激しいえそをもたらす。両者は宿主植物における病徵の生物的性質の他、耐保存性などの物理的性質やアブラムシ伝搬率の違いも認められ、PVY-T は PVY-O に比べより安定なウィルスである。PVY のゲノムは約 10 kb のプラス 1 本鎖 RNA で、単一の読み枠から分子量約 350 k のポリプロテインが翻訳された後、ウィルスゲノムにコードされる 3 種のプロテアーゼによって切断されて機能タンパク質が生産される。

本研究では、まず PVY-O と PVY-T の安定性の違いに着目し、主要な構成タンパク質である外被タンパク質 (CP) の分子性状比較を行った。CP 遺伝子に対する cDNA の塩基配列より予想されるアミノ酸配列を比較した結果、タンパク質の安定性に関与すると考えられている N 末端側に違いが多く存在し、C 末端側は共通であることを明らかにした。

PVY-O と PVY-T を判別するには、タバコなどの判別宿主への接種による検定の他、モノクローナル抗体 (MAb) を用いた血清学的手法による特異的判別が可能である。そこで、次に PVY-O 特異的 MAb PVYO-21H05 および PVY-T 特異的 MAb PVYT-4E7 による系統判別の分子的根拠を明確にするため、各 MAb が認識する PVY 系統特異的エピトープの解析を行った。PVY 粒子をトリプシンで限定分解して調整した CP コア領域は、MAb PVYO-21H05 および MAb PVYT-4E7 に反応しなくなり、C 末端側は共通であることから系統特異的エピトープは CP の N 末端側にあると考えられた。更に CP コア領域の N 末端 20 残基のアミノ酸配列を解析した結果、系統特異的エピトープは N 末端 30 残基内にあることがわかった。PVY-O、PVY-T の CP アミノ酸配列の他、両 MAb と反応しない普通系統の分離株 PVY-36 の CP アミノ酸配列を加え、これら 3 種の CP の N 末端 30 アミノ酸のキメラペプチドを、融合タンパク質として大腸菌で発現させ、両 MAb の反応に必要な配列を更に解析した。その結果、PVY-O 特異的 MAb PVYO-21H05 は N 末端側の 26 から 30 番目のアミノ酸の

$^{26}\text{P---K}^{30}$ の配列を認識していることを明らかにした。この認識配列は世界中の多くの普通系統で保存されているわけではなく、実際 PVY-36 が反応しない理由の 1 つとして 30 番目の K が N に変異しているためと考えられ、MAb PVYO-21H05 では認識できない普通系統が存在することを示唆するとともに、その分子的根拠を明らかにした。一方、PVY-T 特異的 MAb PVYT-4E7 は N 末端側の 10 から 17 番目の $^{10}\text{ST-----Q}^{17}$ の配列を認識していることを明らかにした。この $^{10}\text{ST-----Q}^{17}$ 配列は、世界中の多くの PVY えそ系統で保存されており、MAb PVYT-4E7 が海外でも非常に系統特異性が高いと評価されていることを裏づけた。また、ヨーロッパ諸国で大問題になっている新興系統 NTN は、えそ系統であるが、ジャガイモ塊茎にえそ症状をもたらすもので、 $^{10}\text{ST-----Q}^{17}$ の配列は NTN 系統の分離株にも保存されていることから、NTN 系統も検出できると考えられる。

次に、ゲノムの 3' 末端の塩基配列解析から、PVY-T₁₃ 分離株のゲノムは、CP 遺伝子の途中から下流の 3' 非翻訳領域 (3' NTR) が普通系統の配列に置き換わった組換え体であることを明らかにした。PVY-T₁₃ 株は、原株 PVY-T_H 株に普通系統が混合感染したために、感染植物体より PVY-T として再分離したものである。このことから、混合感染の際に RNA-RNA 組換えが起こって、PVY-T₁₃ ゲノムが生じたものと推察し、これを以下のように実験的に検証した。まず PVY-O_H 分離株と PVY-T_{JT} 分離株の混合感染植物を作り、感染葉から得た PVY ゲノムの 3' 末端領域の cDNA をクローニングした。得られたクローンから PVY の CP を大腸菌で発現させ、系統特異的 MAb による CP アミノ酸配列型の判別を行うとともに、PVY-O_H または PVY-T_{JT} のゲノムに特異的な合成オリゴヌクレオチドプローブによって 3' NTR の塩基配列型を判別した。その結果からキメラ構造をしていると考えられるクローンを選抜し、塩基配列を解析した。その結果、新たに 2 種類の CP 遺伝子内における組換えクローンを得、混合感染による PVY ゲノム間の RNA-RNA 組換えを実証した。

また PVY-T₁₃ ゲノムは多くの部分が未解析のため、未解析領域で更に組換えが生じている可能性が考えられた。また、両系統間の病原性の違い等を解明していく上で重要な礎となるため、PVY-O_H と PVY-T₁₃ ゲノムの未解析領域を解析し、全塩基配列 (PVY-O_H: 9699 塩基、PVY-T₁₃: 9703 塩基) を明らかにした。5' 末端の塩基を詳細に解析した結果、PVY-T₁₃ と PVY-O_H では末端 32 塩基は共通配列で、初めて PVY 全塩基配列が報告されたえそ系統フランス株の 5' 末端 1 塩基が解析できていない可能性を示唆した。PVY-O_H と PVY-T₁₃ ゲノムの全塩基配列を外国産 4 分離株と比較解析した結果、PVY-T₁₃ ゲノムでは CP 遺伝子領域の他に組換えの痕跡は認められず、CP 遺伝子の上流の配列は外国産えそ系統スイス株に最も近縁であった。一方、PVY-O_H は、普通系統カナダ株に最も近縁であった。

また、分子系統進化学的解析により、えそ系統フランス株のゲノムはその大部分の配列が普通系統の配列型で、NIb 遺伝子領域内の 2 箇所と 3' NTR 内の 1 箇所の組換え部位でえそ系統の配列に置き換わっている組換え体であることを明らかにした。更に、新興系統 NTN の 1 分離株であるハンガリー株のゲノムでも 3 箇所の組換え部位が検出された。そのゲノムは、5' 側の 5' NTR から HC-Pro までの遺伝子領域 (約 2.4 kb) はえそ系統の配列、中央部の P3 から 6K₂ までの遺伝子領域 (約 3.3 kb) は普通系統の配列、その下流の NIa 遺伝子領域から CP 遺伝子の 5' 側約 2/3 (約 3.4 kb) まではえそ系統の配列、また CP 遺伝子

の 3' 側約 1/3 から 3' NTR (約 0.6 kb) は普通系統の配列になっており、モザイク構造をした組換え体であることを明らかにした。これらのことから、PVY 系統間でのゲノム RNA 組換えが自然界で通常起こり得る現象で、NTN 系統のような新たな病原性を獲得した新ウイルスが出現する一つの機構であることを示唆した。

学位論文審査の要旨

主査教授 上田一郎
副査教授 増田 稔
副査教授 伴戸 久徳
副査教授 内藤 繁男

学位論文題名

ジャガイモYウイルスえそ系統と普通系統の 分子性状比較とゲノム RNA 間組換えに関する研究

本論文は、4章で構成され、図71、表26、引用文献304、総頁数233の和論文で、他に参考文献7編が添えられている。本研究は、ジャガイモYウイルス(PVY)の系統比較を行い、ウイルス新興系統出現の要因としてRNA組み換え現象を提唱したもので、内容は以下のように要約される。

日本のPVYには、病原性の異なる普通系統(PVY-O)とえそ系統(PVY-T)が存在する。PVY-Oはジャガイモ品種に、えそ型症状や、れん葉型症状をもたらすが、PVY-Tは一般に軽微な病徴を誘導する。しかし、PVY-Tはタバコで激しいえそをもたらし、重要病害となっている。PVYは、長さ約730nmのひも状ウイルスで、そのゲノムは約10kbのプラス1本鎖RNAである。

PVY-OとPVY-Tを判別するには、モノクローナル抗体(MAb)を用いた血清学的手法による特異的判別が可能である。そこで、エピトープ解析によって、PVY-O特異的MAb PVYO-21H05およびPVY-T特異的MAb PVYT-4E7による系統判別の分子的根拠を明確にした。PVY-O、PVY-Tの外被タンパク質(CP)アミノ酸配列の他、両MAbと反応しない普通系統の分離株PVY-36のCPアミノ酸配列を加え、これら3種のCPのN末端アミノ酸のキメラペプチドを、融合タンパク質として大腸菌で発現させ、両MAbの反応に必要な配列を解析した。その結果、PVY-O特異的MAb PVYO-21H05はN末端側の26から30番目のアミノ酸の²⁶P---K³⁰の配列を認識していることを明らかにした。一方、PVY-T特異的MAb PVYT-4E7はN末端側の10から17番目の¹⁰ST-----Q¹⁷の配列を認識していることを明らかにした。この配列は、世界中の多くのPVYえそ系統で保存されており、MAb PVYT-4E7が海外でも非常に系統特異性が高いと評価されていることを裏づけた。

次に、ゲノムの3'末端の塩基配列解析から、PVY-T₁₃分離株のゲノムは、C

P遺伝子の途中から3' 非翻訳領域 (3' NTR) にかけて、普通系統の配列に置き換わった組換え体であることを発見した。PVY-T₁₃株は、原株PVY-T_H株に普通系統が混合感染した植物体よりPVY-Tとして再分離したものである。このことから、混合感染の際にRNA-RNA組換えが起こって、PVY-T₁₃ゲノムが生じたものと推察し、これを実験的に検証した。まずPVY-OH分離株とPVY-TJT分離株の混合感染植物を作り、感染葉から得たPVYゲノムの3' 末端領域のcDNAをクローニングした。得られたクローンからPVYのCPを大腸菌で発現させ、系統特異的MAbによるCPアミノ酸配列型の判別を行うとともに、系統特異的な合成オリゴヌクレオチドプローブによるハイブリダイゼーションで、3' NTRの塩基配列型を判別した。その結果からキメラ構造をしていると考えられるクローン得た。これにより、混合感染によるゲノム間のRNA-RNA組換えを実証した。

またPVY-OHとPVY-T₁₃ゲノムの未解析領域を解析し、全塩基配列 (PVY-OH: 9699塩基、PVY-T₁₃: 9703塩基) を明らかにした。これらゲノムの全塩基配列を外国産4分離株と比較した結果、PVY-T₁₃ ゲノムではCP遺伝子領域の他に組換えの痕跡は認められず、CP遺伝子の上流の配列は外国産えそ系統スイス株に最も近縁であった。一方、PVY-OHは、普通系統カナダ株に最も近縁であった。

また、分子系統進化学的解析により、海外で報告されている2つのPVY分離株が普通系統えそ系統のモザイク構造をした組換え体であることを明らかにした。これらのことから、PVY系統間でのゲノムRNA組換えが自然界で通常起こり得る現象で、病原性を獲得したウイルス新興系統が出現する一つの機構であることを示唆した。

本研究は、PVYゲノムの系統比較をおこない、RNA組み換えがPVY新興系統出現の要因の一つであることを実証したもので、学術上の貢献が大きく、学会においても高く評価されるものである。

よって審査員一同は、畠谷 達児氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。